毕赤酵母 Kex2 蛋白酶的同源表达及酶学性质

王彤　徐岩　喻晓蔚**

(1.江南大学工业生物技术教育部重点实验室　无锡　214122)
(2.宿迁市江南大学产业技术研究院　宿迁　223814)

摘要：Kex2 蛋白酶是一种来源于酵母的前体加工蛋白酶。本研究利用毕赤酵母(*Pichia pastoris*)同源表达来源于毕赤酵母的 Kex2 蛋白酶(PPKex2)，研究其表达特性和酶学性质，同时与毕赤酵母表达的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)Kex2 蛋白酶(SCKex2)进行比较。首先，分别从毕赤酵母和酿酒酵母基因组中获得 Kex2 基因，将其插入到表达载体 pPIC9K 中，并转化毕赤酵母菌株 GS115。重组菌株经甲醇诱导表达后，结果表明 PPKex2 的发酵上清液比活是 SCKex2 的 7 倍。Kex2 蛋白酶经 Q-FF 强阴离子交换柱纯化后进行酶学性质研究。酶学性质研究结果表明，PPKex2 的最适反应 pH 是 8.0-9.0，最适反应温度是 37 ℃，与 SCKex2 性质相近。在稳定性方面，PPKex2 在 pH 7.0 时最稳定，在碱性条件下的稳定性高于 SCKex2，在酸性条件下的稳定性低于 SCKex2，另外 PPKex2 的温度稳定性略低于 SCKex2。酶促反应动力学研究表明，PPKex2 的 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m 值分别为 SCKex2 的 4.8 和 3.3 倍。本文首次报道了同源表达毕赤酵母 Kex2 蛋白酶的表达特性及酶学性质，为其今后的研究及应用奠定了基础。

关键词：Kex2，毕赤酵母，同源表达，酶学性质

Homologous expression and characterization of *Pichia pastoris* Kex2

WANG Tong　XU Yan　YU Xiao-wei**

(*1.Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Jiangnan University，Wuxi, 214122, China*)
(*2.Suqian Industrial Technology Research Institute of Jiangnan University，Suqian, 223814, China*)

Abstract: Kex2 protease is a precursor-processing protease from yeast. In this study, Kex2 protease from *Pichia pastoris* (PPKex2) was homologous expressed in *Pichia pastoris*. Then the expression and enzymatic characteristics of PPKex2 were studied and further compared with the Kex2 protease from *Saccharomyces cerevisiae* (SCKex2) expressed in *Pichia pastoris*. Firstly, these Kex2 genes were cloned from the genomes of *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae,* inserted into pPIC9K expression vector, and then transformed into *Pichia pastoris* GS115. The expression of PPKex2 and SCKex2 were induced by methanol and purified with anion exchange chromatography (Q-FF). Finally, the enzymatic characteristics of these Kex2 protease were characterized. The specific enzyme activity of PPKex2 in the supernatant was seven times higher than that of SCKex2. Enzymatic characterization showed that PPKex2 was similar to SCKex2 and

*Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31671799); Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province(NY-010)

**Corresponding author，E-mail: bioyuxw@aliyun.com

*基金项目：国家自然科学基金面上项目(31671799)；江苏省“六大人才高峰”计划(NY-010)

**通讯作者，电子信箱： bioyuxw@aliyun.com

had the optimal activity at pH 8.0-9.0 and 37 °C. In terms of stability, PPKex2 was most stable at pH 7.0. PPKex2 was more stable than SCKex2 in alkaline pH and less stable than SCKex2 in acidic pH. Meanwhile, the thermostability of PPKex2 is lower compared with that of SCKex2. The kinetic analysis showed that the k_{cat} and k_{cat}/K_m of PPKex2 was 4.8- and 3.3-fold higher than that of SCKex2, respectively. Here we report for the first time the expression and enzymatic characteristics of PPKex2 homologous expressed in *Pichia pastoris*, which shows potential application in the future.

Keywords: Kex2, *Pichia pastoris*, Homologous expression, Enzymatic characteristics

Kex2 蛋白酶(EC.3.4.21.61)是一种来源于酵母的前体加工蛋白酶，属于枯草杆菌蛋白酶家族，是钙离子依赖型的中性丝氨酸蛋白酶，能够特异性的切割碱性氨基酸残基对中的羧基端肽键，如 Lys-Arg，Arg-Arg，Pro-Arg[1-3]。Kex2 蛋白酶在酵母中主要负责切割外源分泌蛋白前体中的信号肽，从而释放出成熟的分泌蛋白，在酵母外源分泌途径中起关键的作用[4, 5]。

自从 1984 年 Thorner 实验室首次发现酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)来源的 Kex2 蛋白酶(SCKex2)[1]，研究人员对 SCKex2 的酶学特性及工业应用都进行了详细研究[6, 7]。人们发现 SCKex2 不仅在酿酒酵母中能够进行前体切割，在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和哺乳动物细胞中外源表达 SCKex2 时，也能够识别前体蛋白中的切割位点，并进行加工产生活性蛋白[8, 9]。另外，研究人员还对 SCKex2 蛋白酶的结构性质及作用机理进行了报道[10-13]。目前，利用毕赤酵母表达的 SCKex2 已作为工具酶商品化，如来自于 Peprotech 和上海雅心等公司的商品酶。人们对 SCKex2 的研究与应用已较为详细，但对于其他酵母来源的 Kex2 蛋白酶报道较少。如 Bader 等报道了光滑假丝酵母(*Candida glabrata*)来源的 Kex2 蛋白酶[14, 15]，随后又研究比较了 4 种酵母来源的 Kex2 蛋白酶底物特异性，包括毕赤酵母 Kex2 蛋白酶(PPKex2)，但对 PPKex2 的表达情况及酶学性质并未进行详细的阐述。Sreenivas 等[4]通过在毕赤酵母中过量表达 PPKex2，从而提高切割外源蛋白甘精胰岛素前体的效率。

本文从毕赤酵母基因组中调取了 Kex2 蛋白酶的基因，利用毕赤酵母表达系统对 PPKex2 进行了同源表达，并对其分离纯化得到了电泳纯的 PPKex2，研究其酶学性质。同时，利用毕赤酵母外源表达 SCKex2，比较了两种 Kex2 蛋白酶的表达情况及酶学性质，为 PPKex2 的研究及应用奠定了基础。

1.材料与方法

1.1 质粒与菌株

Pichia pastoris GS115 菌株、*Saccharomyces cerevisiae* S288c 菌株、大肠杆菌(*EScherichia coli*)JM109 菌株及质粒载体 pPIC9K 均由本实验室保存。

1.2 主要试剂与培养基

快切酶 *Sna*B I、*Avr* II、*Sal* I，*Not* I，T4 DNA Ligase 购自 Takara，G418 抗性购自上海生工，蛋白酶底物 Boc-Gln-Arg-Arg-pNA 购自合肥博美生物。LB 培养基(0.5%(w/v)酵母提取物，1%(w/v)蛋白胨，1%(w/v)NaCl)，YPD 培养基(1%(w/v)酵母提取物，2%(w/v)蛋白胨，2%(w/v)葡萄糖)；发酵培养基 BMGY(1%(w/v)酵母提取物，2%(w/v)蛋白胨，1.34%(w/v)YNB，100 mM 磷酸钾缓冲液 pH 6.0，生物素(w/v)4×10^{-5}%，1%(v/v)甘油)，BMMY(1%(w/v)酵母提取物，2%(w/v)蛋白胨，1.34%(w/v)YNB，100 mM 磷酸钾缓冲液 pH 6.0，生物素(w/v)4×10^{-5}%，1%(v/v)甲醇)。

1.3 表达菌株的构建

采用珠磨法提取毕赤酵母及酿酒酵母的基因组，根据 NCBI 中获得的序列设计引物扩增 Kex2 基因，连接 pMD19T 载体并测序。将 pMD19T-PPKex2 及 pPIC9K 质粒利用 *Sna*B I 和

Avr II 酶在 37 ℃双酶切 20 min，pMD19T-SCKex2 及 pPIC9K 质粒利用 *Sna*B I 和 *Not* I 酶在 37 ℃双酶切 20 min，16 ℃连接 16 h，转化 JM109 感受态细胞，挑取阳性克隆测序验证。将测序正确的克隆提取质粒用 *Sal* I 酶线性化，电转 GS115 感受态细胞，加入 1 mL 山梨醇后 30 ℃静置复苏 1 h，涂布 MD 平板，30 ℃培养 3 d，挑取阳性克隆接种 YPD 试管，提取基因组 PCR 验证阳性克隆。

1.4 Kex2 蛋白酶菌株的表达

将阳性克隆在 YPD+G418 平板上划线，30 ℃培养 3 d，挑取单菌落接种 BMGY 培养基培养 18 h，OD_{600} 达 2−6，离心收集菌体，重悬于 BMMY 培养基中，加入 1%(v/v)甲醇诱导，每 24 h 添加 1%(v/v)甲醇，并取样测定菌体浓度及蛋白浓度。诱导 96 h 后，离心收集上清进行下一步纯化。

1.5 重组 Kex2 蛋白酶的纯化

将发酵上清液超滤更换缓冲液为 10 mM NaAc-HAc(pH 5.0)缓冲液，然后使用 Q-FF(3 cm × 30 cm)强阴离子交换柱进行纯化，先用 10 mM NaAc-HAc(pH 5.0)缓冲液平衡柱子至基线，之后用含 0-500 mM 的 NaCl 的缓冲液进行连续梯度洗脱与收集。洗脱后测定各收集管中液体的 A280 和蛋白酶活性。然后通过 SDS-PAGE 鉴定洗脱蛋白的纯度。

1.6 Kex2 蛋白酶酶活测定方法

Kex2 蛋白酶活性的测定方法采用分光光度法，利用 Boc-Gln-Arg-Arg-pNA(Boc-QRR-pNA)作为底物[16]，Kex2 蛋白酶切割该底物产生对硝基苯胺。底物溶液为 100 μmol/L Boc-QRR-pNA，50 mM 的 Tris-HCl，pH 8.0，2 mM Ca^{2+}。在 25 ℃的条件下，取 200 μL 底物溶液加入 96 孔酶标板，将 Kex2 蛋白酶稀释到 100 μg/mL，每孔加入 20μL，在 25 ℃条件下，每间隔 20s 记录吸光值 A405，连续记录 3 min。酶活力单位(U)的定义为:在 25 ℃、pH 8.0 的条件下，每分钟催化 1 μmol 的 Boc-QRR-pNA 转化为产物所需要的酶量。酶活力公式为 $U(\mu mol/L) = \triangle A/min \times F$，$F= TV/(\varepsilon * L * SV) \times 10^6$，TV 为反应的总体积(0.220 mL)，SV 为样本体积(0.020 mL)，L 为酶标板(0.220 mL)体系的光径，ε为反应体系被检测物质的摩尔消光系数为 7840.58［L/(mol·cm)］。以加入底物溶液但不加酶的体系作为空白对照。

1.7 Kex2 蛋白酶酶学性质研究

1.7.1 最适 pH 和最适温度的测定

经纯化的 Kex2 蛋白酶，分别以 50 mM 的 NaAc-HAc(pH 3.0−6.0)，Tris-HCl(pH 7.0−8.0)，Gly-NaOH(pH 9.0−11.0)缓冲液配置的 Boc-QRR-pNA 溶液作为底物，在 25 ℃下进行酶促反应，以酶活性最高者为 100%，作 pH-相对酶活性曲线。最适反应温度使用两种方法测定，方法一是在 50 mM(pH 9.0)的 Gly-NaOH 缓冲液的条件下，在不同温度(10−90 ℃)条件下测定蛋白酶活性，以不加酶底物为对照。方法二是在 50 mM(pH 9.0)的 Gly-NaOH 缓冲液的条件下，在不同温度下(25−45 ℃)反应 3 h，沸水浴 10 min 终止反应，然后用分光光度法测定产物含量。

1.7.2 pH 稳定性和温度稳定性的测定

pH 稳定性的测定是分别用 20 mM 的 NaAc-HAc(pH 3.0−6.0)，Tris-HCl(pH 7.0−8.0)，Gly-NaOH(pH 9.0−10.0)缓冲液将纯化的酶液于 25 ℃处理 1 h，然后在最适 pH 和最适温度下测定剩余的酶活性，以酶活性最高者为 100%，作 pH-相对酶活性曲线。温度稳定性测定是将酶液在不同的温度下(25 ℃、35 ℃、45 ℃、55 ℃)分别处理 1、2、4、8、12 h 后，在最适 pH 和最适温度下测定剩余的酶活性，以未处理酶液的酶活性为 100%，作温度-相对酶活性曲线。

1.7.3 动力学参数的测定

以不同浓度(5×10^{-6}–2×10^{-4} mol/L)的 Boc-QRR-pNA 作为底物，在最适条件下测定酶活，使用 GraphPad Prism 7.0 软件拟合曲线，计算 K_m 和 k_{cat} 值。

2.结果与分析

2.1 PPKex2 和 SCKex2 的序列分析

使用 DNAMAN 和 ESpript 3.0 软件对 PPKex2 和 SCKex2 的氨基酸序列进行对比分析，并预测了 PPKex2 的二级结构（图 1），发现两种 Kex2 蛋白酶氨基酸序列一致性为 43.43%。

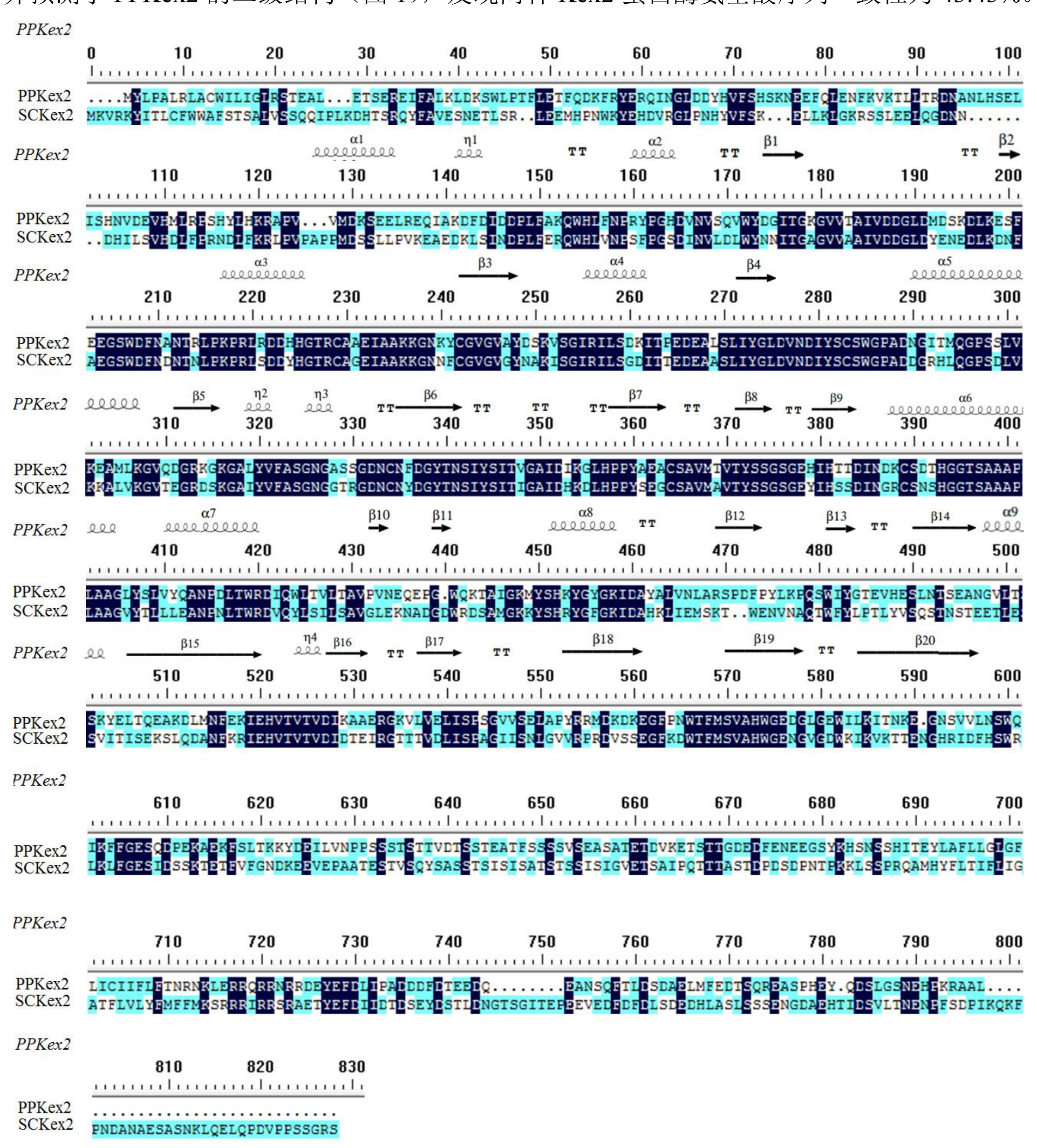


图 1 PPKex2 和 SCKex2 氨基酸序列对比图

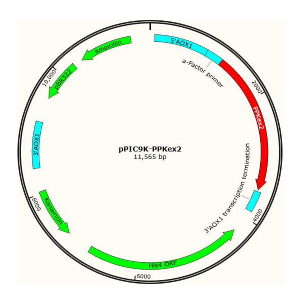
Fig. 1 Alignment of amino acid sequences for the PPKex2 and SCKex2.

Identical amino acid residues were highlighted in dark blue，the predicted secondary structure of

PPKex2 above the sequence.

2.2 重组菌株的构建与表达

PPKex2 和 SCKex2 的表达质粒分别为 pPIC9K-PPKex2 和 pPIC9K-SCKex2(图 2)，在构建过程中利用 pPIC9K 中的α-信号肽取代 Kex2 的自身信号肽，Kex2 基因置于 *AOX1* 启动子下游，用于甲醇诱导表达。在甲醇诱导阶段，每 24 h 取样检测菌体浓度和蛋白浓度，并进行 SDS-PAGE 分析。如图 3 所示，随着诱导时间的增加，发酵上清中的 Kex2 蛋白酶浓度逐渐增加。在甲醇诱导 96 h 后，PPKex2 的发酵上清液中蛋白浓度达到 0.42 mg/mL，比活达到 70 U/g；SCKex2 的发酵上清液中蛋白浓度达到 0.85mg/mL，比活达到 10 U/g。



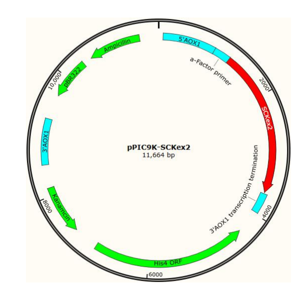


图 2　pPIC9K-PPKex2 和 pPIC9K-SCKex2 的质粒图

Fig. 2　Plasmid map of pPIC9K-PPKex2 and pPIC9K-SCKex2.

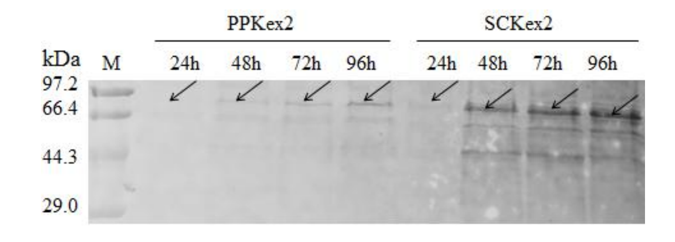


图 3　PPKex2 和 SCKex2 菌株发酵液上清的 SDS-PAGE 图

Fig. 3　SDS-PAGE of the supernatant of PPKex2 and SCKex2 at different induction time.

2.3 Kex2 蛋白酶的纯化

取诱导 96 h 的发酵液，经离心、超滤和离子交换层析后，PPKex2 在 250-400 mM NaCl 下出现最高洗脱峰，收集 260-300 mM NaCl 下的洗脱峰；SCKex2 在 350-500 mM NaCl 下出现最高洗脱峰，收集 380-450 mM NaCl 下的洗脱峰。得到电泳纯的 PPKex2 和 SCKex2，SDS-PAGE 均显示单一的条带(图 4)，两者表观分子量都约为 88 kDa，与理论分子量一致。

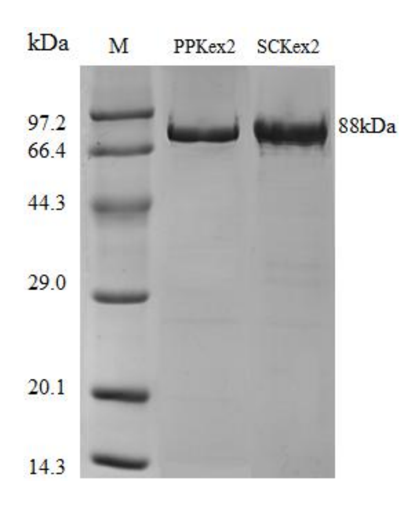


图 4：纯化的 PPKex2 和 SCKex2 的 SDS-PAGE 图

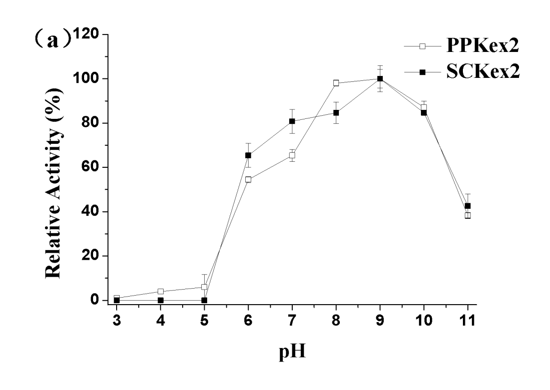
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the purified PPKex2 and SCKex2

2.4 Kex2 蛋白酶的酶学性质

2.4.1 最适反应 pH 和最适反应温度

最适反应 pH 测定结果如图 5(a)所示，两种 Kex2 的 pH 曲线相类似，PPKex2 和 SCKex2 的最适反应 pH 分别为 pH 8.0−9.0 和 pH 9.0；在 pH 5.0 以下，蛋白酶基本丧失活性，在 pH 7.0−10.0 之间有较高活性。其中在 pH 6.0−7.5 之间，SCKex2 的活性高于 PPKex2；在 pH 7.5−9.0 之间，PPKex2 的活性高于 SCKex2，pH 9.0 以上两者活性相似。

最适反应温度采用两种测定方法。我们首先采用了方法一(材料与方法 1.7.1)在不同温度下测定初始反应速率(图 5(b))，结果表明随着反应温度的升高，反应速率增大，呈线性相关，在设定的反应条件下，在 90 ℃时初始反应速率最高。仅加入底物的空白对照表明，随温度的升高吸光值不变，表明底物较为稳定。方法一中测定酶促初始反应速度，反应时间为 3 min，虽然温度越高反应速率越快，但是考虑到实际应用过程中蛋白酶加工时间需要 1-3 h，在高温下反应酶易于失活，因此本文又采用了方法二(材料与方法 1.7.1)在不同温度下酶促反应 3 h 后测定产物的产率，从而获得应用过程中的最适作用温度，从图 5(c)中可以看出 PPKex2 的最适作用温度为 37 ℃；而 SCKex2 最适作用温度为 40 ℃，而且 PPKex2 的作用温度较宽。



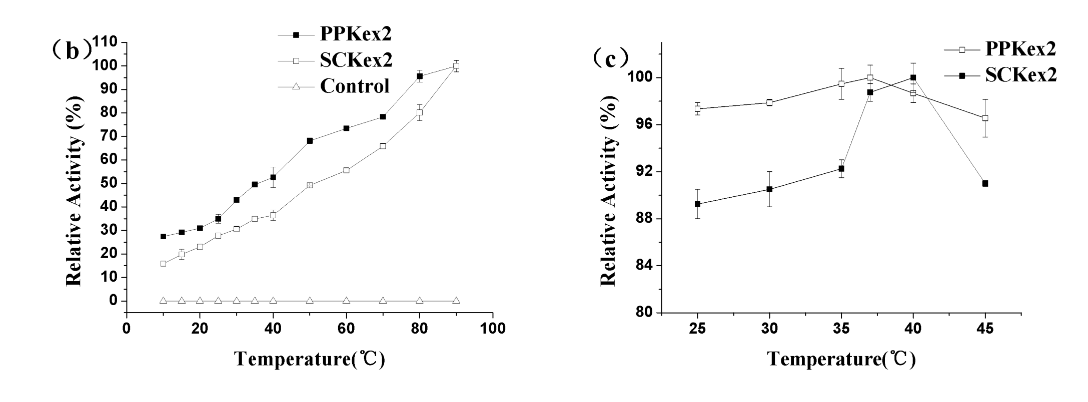


图 5　PPKex2 和 SCKex2 的最适反应 pH(a)和最适反应温度(b) (c)

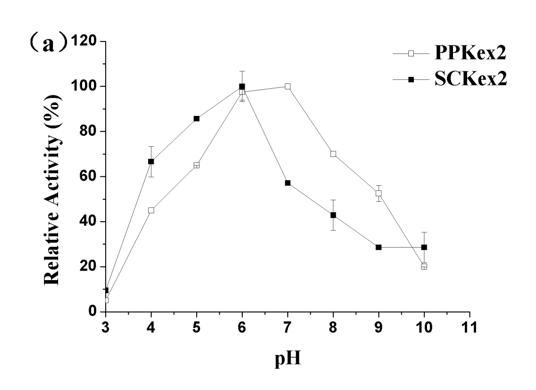
Fig. 5　The optimal pH and temperature of PPKex2 and SCKex2.

(a):The optimal pH of PPKex2 and SCKex2. (b): The initial reaction rate of PPKex2 and SCKex2 at different temperature with method 1. (c): The optimal temperature of PPKex2 and SCKex2 with method 2.

2.4.2 pH 稳定性和温度稳定性

pH 稳定性测定结果如图 6(a)所示，经 pH 3.0 和 pH 10.0 处理后，两种 Kex2 蛋白酶基本没有活性。PPKex2 在 pH 5.0−8.0 之间较为稳定，在 pH 7.0 时最稳定。而 SCKex2 在 pH 4.0−6.0 之间较为稳定，在 pH 6.0 时最稳定性。在低于 pH 6.0 时，SCKex2 的稳定性高于 PPKex2，而高于 pH 6.0 时，PPKex2 的稳定性高于 SCKex2。

温度稳定性研究结果如图 6(b)-(c)所示，两种蛋白酶的酶活降低速率都随着温度的升高而加快。PPKex2 在 25 ℃保温时，2 h 前相对酶活力保持在 88%，但保温 12 h 后残余活力为 45%，在 55 ℃保温 1 h 后，PPKex2 的活性就完全丧失。而 SCKex2 在 25 ℃条件下相对稳定，保温 12 h 后，相对酶活力保持在 75%，55 ℃下保温 4 h 后，SCKex2 的活性就完全丧失。在相同温度下，PPKex2 的温度稳定性低于 SCKex2。



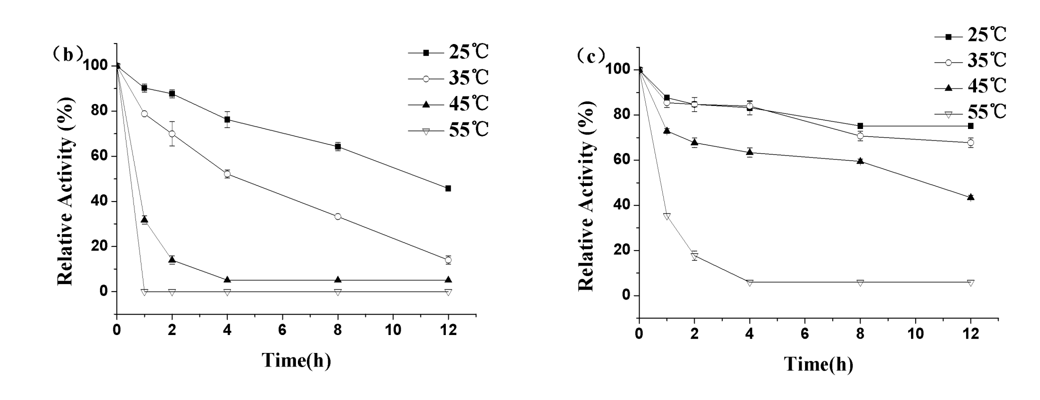


图 6　PPKex2 和 SCKex2 的 pH 稳定性(a)和温度稳定性(b) (c)

Fig. 6　The pH- stability and thermostability of PPKex2 and SCKex2.

(a):The pH-stability of PPKex2 and SCKex2. (b):The thermostability of PPKex2. (c):The thermostability of SCKex2.

2.4.3 动力学参数的测定

动力学参数的测定结果如表 1 所示，PPKex2 的 K_m 值大于 SCKex2，k_{cat} 值和 k_{cat}/K_m 值分别为 SCKex2 的 4.8 和 3.3 倍。

表 1　PPKex2 和 SCKex2 动力学参数

Table 1　The Kinetic constant of PPKex2 and SCKex2.

Strain	K_m(mmol/L)	k_{cat}(s^{-1})	k_{cat}/K_m (Lmmol^{-1} s^{-1})
PPKex2	0.02758	1.16	42.06
SCKex2	0.01856	0.24	12.93

3.讨论

Kex2 蛋白酶在酵母的蛋白分泌途径中起到关键作用，在哺乳动物细胞的研究中也应用广泛，目前 SCKex2 已实现商品化。对 Kex2 蛋白酶的表达，毕赤酵母表达体系应用较为广泛，但目前仅有 Sreenivas[4]和 Bader[15]对 PPKex2 进行了研究，有关 PPKex2 的外源活性表达与酶学性质的研究还鲜有报道。

我们通过比较 PPKex2 与 SCKex2 的氨基酸序列及二级结构，发现两者均由信号肽、前肽、催化结构域、P 结构域、Thr/Ser 富集区以及跨膜区组成，但序列一致性仅为 43.43%，预测两者酶学特性可能会存在较大差异。本研究从毕赤酵母基因组中扩增出 Kex2 蛋白酶基因，利用毕赤酵母表达系统对 PPKex2 进行了同源表达，对其分离纯化得到了电泳纯的 PPKex2。并与目前研究最为广泛的 SCKex2 进行了比较。在摇瓶水平，PPKex2 的发酵上清液中的比活比 SCKex2 高 7 倍。纯化后，比较两种蛋白酶的酶学性质，表明 PPKex2 的催化活性显著高于 SCKex2，动力学参数 k_{cat} 比 SCKex2 高 4.8 倍。PPKex2 的最适反应 pH 为 8.0–9.0，最适反应温度为 37 ℃，在 pH 7.0 时稳定性最高。SCex2 的最适反应 pH 为 9.0，最适反应温度为 40 ℃，在 pH 6.0 时稳定性最高，与已有报道基本一致[12, 13]。总体比较，PPKex2 在碱性条件下稳定性高于 SCKex2，在酸性条件下稳定性低于 SCKex2；而温度稳定性 PPKex2 低于 SCKex2，高温下更易失活。

本研究表明 PPKex2 催化活性高，具有重要的潜在应用价值，通过基因工程技术实现

PPKex2 的同源高效表达是降低其应用成本的有效手段。目前对提高毕赤酵母外源表达量的方法，报道较多的是启动子改造[17]，高拷贝菌株筛选[18]及发酵优化[19]等。本研究后期将进一步提高 PPKex2 的表达水平，从而为 PPKex2 蛋白酶的商品化应用奠定基础。

参考文献：

[1] David J, Anthony B, Lindley B, et al.Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-a-factor[J]. Cell, 1984, 37(3): 1075-1089.

[2] Mizuno K, Nakamura T, Ohshima T, et al. Yeast Kex2 genes encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1988, 156(1): 246-54.

[3] Fuller RS, Brake A, Thorner J. Yeast prohormone processing enzyme (Kex2 gene product) is a Ca^{2+}-dependent serine protease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(5): 1434-8.

[4] Sreenivas S, Krishnaiah SM, Govindappa N, et al. Enhancement in production of recombinant two-chain Insulin Glargine by over-expression of Kex2 protease in *Pichia pastoris*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(1): 327-36.

[5] Cunningham KW, Wickner WT. Yeast Kex2 protease and mannosyltransferase I are localized to distinct compartments of the secretory pathway[J]. Yeast, 1989, 5(1): 25-33.

[6] Staniszewska M, Bondaryk M, Kazek M, et al. Effect of serine protease Kex2 on *Candida albicans* virulence under halogenated methyl sulfones[J]. Future Microbiol, 2017, 12: 285-306.

[7] Antunes AA, Jesus LOP, Manfredi MA, et al. Thermodynamic analysis of Kex2 activity: The acylation and deacylation steps are potassium- and substrate-dependent[J]. Biophys Chem, 2018, 235: 29-39.

[8]冯兴军，李静，宋雪莹等. 抗菌肽 FAPs 在毕赤酵母中的重组表达研究[J]. 东北农业大学学报, 2013,44(9): 68-72.

Feng XJ, Li J, Song XY, et al. Study on recombinant expression of antimicrobial peptides FAPs in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(9): 68-72. (in Chinese)

[9] Thomas G, Thorne BA, Thomas L, et al. Yeast Kex2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells[J]. Science, 1988, 241(4862): 226-30.

[10] Brenner C, Fuller RS. Structural and enzymatic characterization of a purified prohormone-processing enzyme: secreted, soluble Kex2 protease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(3): 922-6.

[11] Holyoak T, Wilson MA, Fenn TD, et al. 2.4 A resolution crystal structure of the prototypical hormone -processing protease Kex2 in complex with an Ala-Lys-Arg boronic acid inhibitor[J]. Biochemistry, 2003, 42(22): 6709-18.

[12] 刘颖颖，王之可，李素霞. Kex2 蛋白酶在毕赤酵母中的表达、纯化和性质研究.[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 37-42.

Liu YY, Wang ZK, Li SX. Expression, purification and properties of recombinant Kex2 in *Pichia Pastoris*.[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2015, 35(1): 37-42. (in Chinese)

[13] Brennan SO, Peach RJ. Calcium-dependent Kex2-like protease found in hepatic secretory vesicles converts proalbumin to albumin[J]. FEBS Lett, 1988, 229(1): 167-70.

[14] Bader O, Schaller M, Klein S, et al. The Kex2 gene of *Candida glabrata* is required for cell surface integrity[J]. Mol Microbiol, 2001, 41(6): 1431-44.

[15] Bader O, Krauke Y, Hube B. Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans, C. glabrata, Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*[J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 1-16.

[16] Wheatley JL, Holyoak T. Differential P1 arginine and lysine recognition in the prototypical proprotein convertase Kex2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(16): 6626-31.

[17] Vogl T, Sturmberger L, Kickenweiz T, et al. A toolbox of diverse promoters related to methanol utilization:

functionally verified parts for heterologous pathway expression in *Pichia pastoris*[J]. ACS Synth Biol, 2016, 5(2): 172-86.

[18] Fang C, Wang Q, Selvaraj JN, et al. High copy and stable expression of the xylanase XynHB in *Saccharomyces cerevisiae* by rDNA-mediated integration[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8747.

[19] Fang Z, Xu L, Pan D, et al. Enhanced production of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris* via genetic and fermentation strategies[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2014, 41(10): 1541-51.